

Trousse pour la détermination radioimmunologique de la thyrotrophine humaine (hTSH).

Contenu de la trousse :

- 1 flacon de traceur ^{125}I -anticorps **anti-hTSH** (monoclonal, souris), < 300 kBq, contenant 11,5 ml de tampon, de l'albumine bovine, des anticorps monoclonaux de souris, de l'azoture de sodium et un colorant rouge.
- 2 x 50 **tubes revêtus d'anticorps** anti-hTSH (monoclonal, souris).
- 7 flacons de **calibrateurs** de hTSH, contenant chacun 1 ml de sérum humain, de l'albumine bovine et de l'azoture de sodium, concentration allant de 0 à 65 $\mu\text{UI/ml}$ hTSH humaine.
- 1 flacon de **sérum de contrôle** hTSH, contenant 1 ml de sérum humain, de l'albumine bovine et de l'azoture de sodium, concentration indiquée sur l'étiquette.
- 1 **réactif de lavage**, 3 comprimés sous blister.
- 1 sachet plastique
- 1 mode d'emploi.

Certains réactifs contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur. Eviter toute absorption des réactifs ainsi que tout contact avec la peau ou les muqueuses. L'azoture de sodium peut réagir avec les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azotures de métaux fortement explosifs. Les diluer abondamment lors de l'évacuation des déchets.

1. Introduction

La thyrotrophine (TSH), hormone antéhypophysaire, est une glycoprotéine d'un poids moléculaire d'environ 30.000, composée de deux sous-unités différentes, à savoir d'une chaîne α et d'une chaîne β . Seule la molécule entière intacte (hTSH) est biologiquement active. Les autres hormones glycoprotéiques, telles hLH, hFSH, hCG, se composent également de deux sous-unités. Les sous-unités α de ce groupe d'hormones sont pratiquement identiques, tandis que les sous-unités β sont spécifiques de l'hormone et se distinguent les unes des autres par leur structure.

2. Résultats cliniques obtenus avec le RIA-gnost® hTSH

2.1. Importance clinique du dosage de l'hTSH

Un rétro-contrôle s'effectue entre la thyroïde, l'hypophyse, l'hypothalamus et les hormones thyroïdiennes circulant dans le sang, à savoir la triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4), (Fig. 1).

Une neurosécrétion, l'hormone libérant la thyrotrophine (TRH), est élaborée dans l'hypothalamus. La TRH provoque la libération de la thyrotrophine (TSH) par l'hypophyse et stimule également sa synthèse. De son côté, la TSH entraîne une synthèse et une libération accrue de T4 et de T3. La libération de la TSH est commandée par la fraction circulante métaboliquement active des hormones thyroïdiennes. En cas de concentration élevée de la fraction libre de ces hormones à la périphérie, le taux sérique de TSH est par conséquent abaissé ou, inversement, il est élevé si la concentration susmentionnée est faible.

Le mécanisme d'action décrit sert de base au test à la TRH. Chez les sujets dont la thyroïde fonctionne normalement, l'administration de TRH synthétique provoque une excrétion de TSH par l'hypophyse pouvant être mesurée par voie radioimmunologique. Dans l'hyperthyroïdie, la synthèse de la TSH cesse par suite du rétro-contrôle précité, si bien que cette hormone ne peut être libérée. En cas d'hypothyroïdie, par contre, le rétro-contrôle entraîne, sous la stimulation de la TRH, un taux accru de TSH dans l'hypophyse et une élévation exagérée du taux de TSH déjà accru au départ.

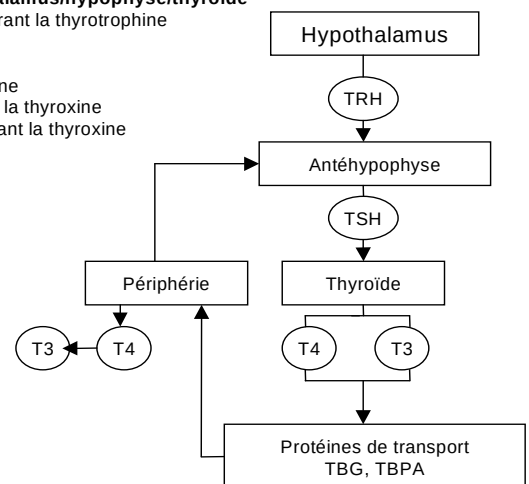
2.2. Taux normaux

Dans le cadre de l'étude clinique du RIA-gnost® hTSH, la plage normale du taux sérique de hTSH chez les hommes et les femmes a été établie :

Euthyroïdie	0,25 – 4	$\mu\text{UI/ml}$	(n = 1966)
Hyperthyroïdie	< 0,25	$\mu\text{UI/ml}$	(n = 182), dans la majorité des cas < 0,1 $\mu\text{UI/ml}$
Hypothyroïdie	≥ 5	$\mu\text{UI/ml}$	(n = 50)

Fig. 1 : Axe hypothalamus/hypophyse/thyroïde

TRH Hormone libérant la thyrotrophine
TSH Thyrotrophine
T4 Thyroxine
T3 Triiodothyronine
TBG Globuline liant la thyroxine
TBPA préalbumine liant la thyroxine



Après stimulation par la TRH, le taux de TSH atteint chez les sujets sains 2-30 $\mu\text{UI/ml}$ ($n=417$). En cas d'hyperthyroïdie, le taux de TSH est inférieur à 0,5 $\mu\text{UI/ml}$ ($n = 59$), tandis qu'en cas d'hypothyroïdie, il peut dépasser 30 $\mu\text{UI/ml}$ ($n = 8$). En cas d'affections générales graves et prolongées, le taux sérique de TSH peut subir des modifications ou, tout au moins, la réponse de la TSH à la stimulation par la TRH peut être réduite. Une hypocalcémie ou certains médicaments peuvent stimuler la sécrétion de TSH (par exemple les antagonistes de la dopamine, les iodures) ou l'inhiber (par exemple la L-dopa, les corticoïdes). Avec l'âge, il peut se produire une légère baisse du taux de TSH et une diminution de la sécrétion de TSH stimulée par la TRH.

3. Principe du dosage et caractéristiques du RIA-gnost® hTSH

3.1. Principe du dosage

Le RIA-gnost® hTSH permet de doser in vitro la thyrotrophine dans le sérum (ou le plasma) humain d'après le principe du test sandwich à 1 étape. Au cours de ce test, il se forme un complexe entre l'anticorps anti-hTSH (monoclonal, souris) fixé sur la paroi du tube, la TSH contenue dans l'échantillon et l'anticorps anti-hTSH marqué à l' ^{125}I (monoclonal, souris). Une fois la réaction effectuée, la partie libre du traceur est éliminée par décantation (ou aspiration) et rinçage.

La fraction de traceur spécifiquement fixée sur les tubes revêtus d'anticorps est mesurée à l'aide d'un compteur gamma.

L'évaluation des résultats fournis par les échantillons inconnus se fait à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie dans des conditions identiques.

En cas de dosages effectués en double, on peut traiter au maximum 42 échantillons de patients avec une seule courbe d'étalonnage. Les anticorps monoclonaux contenus dans la trousse sont hautement spécifiques de la TSH. Une réaction croisée avec hLH, hFSH et hCG, dans les plages de concentrations importantes sur le plan physiologique est pratiquement exclue.

Les échantillons dépassant la plage de mesure sont dilués avec le tampon de lavage.

La standardisation a été réalisée par rapport au standard hTSH WHO 80/558.

Remarques : la sensibilité extrêmement élevée du test ne peut donner toute sa mesure que si l'on respecte les précautions suivantes :

- Eviter que les tubes subissent une contamination venant de l'extérieur.
- Éliminer intégralement la fraction de traceur non liée (par décantation ou aspiration). En cas d'aspiration, veiller à ce que les capillaires ne soient pas bouchés. Après la décantation, éliminer tout liquide restant en tapotant les tubes sur un papier absorbant.
- Contrôler que l'appareil de mesure et les portoirs éventuellement utilisés ne soient pas contaminés. Si nécessaire, effectuer une décontamination.
- Exclure toute influence perturbante de sources externes de rayonnement.

3.2. Caractéristiques spécifiques du dosage

3.2.1. Imprécision

Elle a été évaluée à l'aide de 3 échantillons dosés 10 fois dans la même série et dans 10 séries différentes.

Intra-essai			Inter-essai		
Echantillons	Moyenne ($\mu\text{UI/ml}$)	CV (%)	Echantillons	Moyenne ($\mu\text{UI/ml}$)	CV (%)
1	0,30	5,7	4	1,55	5,4
2	3,95	1,5	5	3,61	4,8
3	28,7	1,2	6	9,81	2,4

3.3 Limite de détection

La limite de détection est définie comme étant la plus petite concentration détectable différente de 0 avec une probabilité de 95 %. Elle a été évaluée à 0,03 $\mu\text{UI/ml}$.

4. Mode d'emploi

4.1. Matériel nécessaire

Micropipettes avec embout plastique interchangeable de 100 μl et 200 μl , éprouvettes graduées, agitateur horizontal (300 ± 50 tr/min), compteur gamma réglé pour la mesure de l'iode 125.

4.2. Préparation des réactifs

Avant utilisation porter à température ambiante (entre 18 et 25°C) les composants de la trousse conservés entre +2 et +8°C. Pour préparer le tampon de lavage, dissoudre les trois comprimés de tampon dans 300 ml d'eau distillée.

Conserver tous les réactifs non utilisés à une température comprise entre +2 et +8°C. Les tubes revêtus d'anticorps sortis de leur emballage et non utilisés doivent être stockés dans le sachet plastique fourni dans la trousse.

4.3. Préparation des échantillons

Après le prélèvement sanguin, préparer le sérum ou le plasma selon le procédé habituel. Le sérum ou le plasma peut être utilisé immédiatement pour le test ou conservé pendant 3 jours au maximum entre +2 et +8°C. Pour une conservation plus longue, une température de -20°C est recommandée. Après décongélation, bien agiter les échantillons de sérum.

4.4. Mises en garde et précautions d'emploi

Les matières premières d'origine humaine contenues dans les réactifs de cette trousse ont été testées avec des trousse agréées et trouvées négatives en ce qui concerne les anticorps anti-HIV 1, anti HIV 2, anti-HCV et l'antigène HBs. Cependant aucune méthode d'analyse ne permet à ce jour de garantir totalement qu'une matière première d'origine humaine soit incapable de transmettre l'hépatite, le virus HIV, ou toute autre infection virale. Aussi faut-il considérer toute matière première d'origine humaine, y compris les échantillons à doser, comme potentiellement infectieuse.

4.5. Protocole de dosage

1. Numéroté un nombre suffisant de tubes revêtus d'anticorps comme indiqué dans le tableau 1 (calibrateurs, sérum de contrôle, échantillons à doser).
2. Distribuer 200 µl de calibrateurs ou d'échantillon à doser au fond des tubes. Utiliser un nouvel embout pour chaque échantillon.
3. Distribuer 100 µl de ^{125} I-anti-hTSH dans chaque tube.
4. Agiter les tubes sur un agitateur horizontal (300 ± 50 tr/min) pendant 2 h à une température comprise entre 18 et 25°C.
5. Distribuer dans chaque tube 1 ml de tampon de lavage, décanter (aspirer) et rincer avec 1 ml.
6. Mesurer la radioactivité des tubes pendant 1 minute à l'aide d'un compteur gamma.

4.6. Lecture des résultats

Un exemple de courbe d'étalonnage du RIA-gnost® hTSH est montré à la figure 2.

Porter sur du papier millimétré préparé à cet effet d'une part les coups par minute des calibrateurs CAL₀ à CAL₆, et d'autre part la concentration de TSH correspondante (µUI/ml). Construire la courbe étalon en reliant les points. Marquer les valeurs du sérum de contrôle et des échantillons à doser, puis lire sur la courbe d'étalonnage la concentration en TSH.

4.7. Interférences

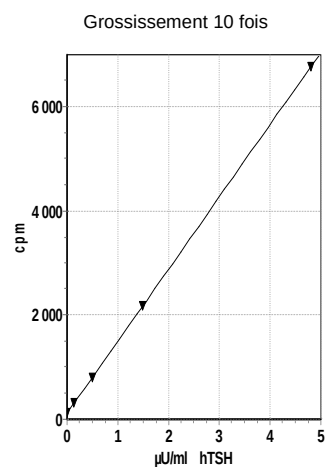
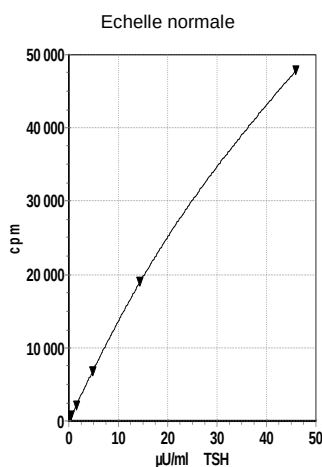
La présence de bilirubine, d'hémoglobine et de triglycérides à des concentrations jusqu'à 250 mg/L, 5 g/l et 20 g/l n'ont pas d'effet sur les résultats du dosage. L'immuno-dosage est protégé contre les anticorps hétérophiles. Cependant, nous ne pouvons pas garantir que cette protection soit exhaustive.

Tab 1 : Protocole de dosage du test hTSH

		Calibrateurs (µl)							Sérum de contrôle (µl)	Echantillons (µl)		
N° des tubes		CAL ₀	CAL ₁	CAL ₂	CAL ₃	CAL ₄	CAL ₅	CAL ₆	C	1	2	Etc.
Calibrateurs	CAL ₀	200/200										
	CAL ₁		200/200									
	CAL ₂			200/200								
	CAL ₃				200/200							
	CAL ₄					200/200						
	CAL ₅						200/200					
	CAL ₆							200/200				
Sérum de contrôle									200/200			
Echantillons										200/200		Etc.
											200/200	
Traceur anti-hTSH	←----- 100 µl -----→											
	Agiter pendant 2 h (300 ± 50 tr/min)											
Tampon de lavage	←----- 1 ml -----→											
	Décanter (aspirer) ; laver avec 1 ml											
	Compter											

(Fig.2) Exemple d'une courbe d'étalonnage

Groupes de tubes	cpm moyens	Concentration µU/ml
Calibrateur 0	117	0.00
Calibrateur 1	309	0.14
Calibrateur 2	806	0.50
Calibrateur 3	2171	1.49
Calibrateur 4	6764	4.80
Calibrateur 5	18963	14.40
Calibrateur 6	47913	46.00
Contrôle	2870	2.10



5. Règles de base de radioprotection

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires couverts par cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée ni à l'homme ni aux animaux. L'achat, la détention, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur.

L'application des règles de base de radioprotection assure une sécurité adéquate.

Un aperçu en est donné ci-dessous :

Les produits radioactifs seront stockés dans leur conteneur d'origine dans un local approprié.

Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour.

La manipulation de produits radioactifs se fera dans un local approprié dont l'accès doit être réglementé (zone contrôlée).

Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques en zone contrôlée.

Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.

Eviter le contact direct avec tout produit radioactif en utilisant des blouses et des gants de protection.

Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes.

Chaque cas de contamination ou perte de substance radioactive devra être résolu selon les procédures établies.

Toute élimination de déchets radioactifs se fera conformément aux réglementations en vigueur.